

УДК: 616-053.2-008.64

Д.А. Шкурупій, Н.Л. Куценко, Т.В. Мамонтова

Імунні ланки патогенезу синдрому поліорганної недостатності у
новонароджених

Вищій державний навчальний заклад України «Українська медична
стоматологічна академія»

Курс анестезіології та інтенсивної терапії (завідувач курсу – к.мед.н, доцент
Д.А. Шкурупій), науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних
основ розвитку патології та фармакогенетики (директор – д.мед.н, професор
Л.Е. Весніна)

Вступ. В сучасних умовах проблема розвитку синдрому поліорганної недостатності (СПОН) у пацієнтів відділень інтенсивної терапії є досить актуальною. Це пов'язано з тим, що одним з основних факторів формування даного синдрому є пролонгація критичного стану у хворих, які до цього в подібних умовах зазнавали швидкого фатального закінчення перебігу захворювання. В свою чергу цей феномен пов'язаний з удосконаленням медичної апаратури і тактики ведення критичних пацієнтів, що призводить до їх тривалого перебування в умовах інтенсивної терапії [5].

Патогенез СПОН наразі чітко не з'ясований, але основою його розвитку здебільше вважають порушення імунного захисту і запуск спотворених імунних реакцій з розвитком синдрому системної запальної відповіді [1, 5]. Значну роль у формуванні імунопатогенезу при СПОН відводять Т-клітинним реакціям і розвитку апоптозу [9].

У новонароджених імунна система знаходиться в процесі формування. Зокрема, це стосується розпізнавання молекул головного комплексу гістосумісності, рівня продукції інтерферонів, змін вмісту і функціональної активності Т-, В-лімфоцитів, нейтрофілів, рівня цитокінів [2, 3]. Внаслідок особливостей функціонування імунної системи можна припустити

особливості імунопатогенезу СПОН у новонароджених, однак, цій проблемі присвячені лише поодинокі наукові праці.

Мета дослідження: визначення особливостей функціонування імунної системи у новонароджених із СПОН шляхом вивчення експресії антигенів диференціації Т-лімфоцитів (CD4, CD8), маркеру активованих моноклеарів (CD95), визначення імунорегуляторного індекса (ІРІ), який являє собою співвідношення CD4/CD8 та рівня інтерферону-альфа (ІФН- α) у плазмі крові.

Матеріали і методи дослідження. В період з 2011 по 2012 роки проведене обстеження 89 новонароджених – пацієнтів дитячих стаціонарів міст Полтава та Кременчука, що перебували на лікуванні з приводу наслідків асфіксії при народженні та перинатального інфікування. Основну групу (n=56) склали новонароджені з ознаками СПОН, яким проводилась інтенсивна терапія. Групу порівняння (n=33) склали новонароджені, які не мали ознак СПОН, не потребували інтенсивної терапії і перебували на лікуванні у відділеннях патології та виходжування новонароджених. Наявність СПОН визначали при одночасній наявності розладів двох і більше органів чи систем за авторською шкалою [10].

Перед початком дослідження були отримані інформовані згоди батьків та дозвіл комісії з етичних питань та біоетики вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» (протокол №57 від 19.02.2008 року).

Експресію CD4, CD8 та CD95 визначали наступним чином: суспензію моноклеарів отримували з периферичної крові за стандартною методикою [6] шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну (густина 1,077 г/мл) із наступним відмиванням у 0,15М фізіологічному розчині та подальшим ресуспензуванням.

Для визначення фенотипу лімфоцитів периферичної крові були використані моноклональні антитіла (мишині імуноглобуліни G) до CD4,

CD8 та CD95 мічені флюорисцеїнізотіоціонатом (виробництво фірми Сорбент, Росія). Для ізотипічного контролю використовували мишині імуноглобуліни G, кон'юговані флюорисцеїнізотіоціонатом. Для визначення експресії CD4, CD8 та CD95 до 50 мкл суспензії мононуклеарів периферійної крові додавали 5 мкл мКАТ та інкубували протягом 20 хвилин при 4°C.

Фенотип лімфоцитів визначали аналізуючи проби на проточному цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II™ software. Для збудження флюорисценції використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм. Додатково до флюорисцентних параметрів проводили реєстрацію прямого та бокового світорозсіювання клітин, що дозволяло виключати з аналізу конгломерати клітин, їх уламки та обмежити зону розташування мононуклеарів периферичної крові [7].

Концентрацію імунорегуляторного цитокіну ІФН- α у плазмі крові новонароджених визначали імуноферментним методом за допомогою тест-системи відповідно до протоколів виробника (НВФ «Цитокин», м. Санкт-Петербург, Російська Федерація).

Статистичний аналіз проводили з використанням програмного забезпечення STATISTICA 6.0. за допомогою методів описової статистики з обчисленням середнього арифметичного (M), помилки репрезентативності (m), медіани (Me) і квартильного розмаху (50L, 50U), а також за допомогою непараметричних критеріїв: Вілкоксона-Манна-Уїтні (U), коефіцієнту кореляції (R) Спірмена. За мінімальний рівень безпомилкового прогнозу вважали $P = 0,95$ і, відповідно, рівнем імовірності помилки - $p < 0,05$. [8].

Результати та їх обговорення. При аналізі експресії CD4, CD8 та CD95 у новонароджених залежно від факту наявності СПОН були отримані дані, наведені в табл. 1. Ці дані демонструють у новонароджених із СПОН наявність меншого відсотку лімфоцитів, фенотипованих як CD4⁺, порівняно із новонародженими без такого синдрому.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика рівнів експресії CD4, CD8 та CD95 у новонароджених залежно від факту наявності синдрому поліорганної недостатності

Ознака	Новонароджені без СПОН						Новонароджені із СПОН						U	p
	n	M±m	Me	50L	50U	Σr	n	M±m	Me	50L	50U	Σr		
CD4, %	33	35,9±2,2	38,0	25,0	43,0	1201,0	26	25,2±2,4	22,5	18,0	31,0	569,0	218,0	0,01
CD8, %	33	12,6±1,0	11,0	9,0	15,0	1006,5	26	14,7±2,0	10,5	6,0	24,0	763,5	412,5	0,80
CD95, %	33	8,2±1,3	6,0	3,0	10,0	994,5	26	7,8±1,2	6,5	3,0	11,0	775,5	424,5	0,94

У новонароджених із СПОН були відмічені зміни ІРІ в бік його зменшення: в основній групі він становив $2,5 \pm 0,4$ ($Me=2,2$; $50L=1,17$; $50U=3,0$; $\Sigma r=645,5$; $n=26$), в групі порівняння аналогічний показник склав $3,2 \pm 0,3$ ($Me=2,6$; $50L=2,2$; $50U=3,8$; $\Sigma r=1124,5$; $n=33$) ($U=294,5$; $p=0,04$).

При аналізі кореляційних зв'язків у обстежених дітей були виявлені статистично значимі показники кореляції між:

- CD4 і CD95 ($R=0,6$; $p<0,001$);
- CD8 і CD95 ($R=0,4$; $p=0,01$);
- CD8 і ІРІ ($R=-0,7$; $p=0,01$).

У дітей із СПОН статистично значимі кореляційні зв'язки були виявлені між:

- CD4 і ІРІ ($R=0,44$; $p<0,02$);
- CD8 і ІРІ ($R=-0,7$; $p<0,01$).

Статистично значиме зниження ІРІ у дітей із СПОН свідчить про імуносупресивний (порівняно із дітьми без СПОН) напрямок імунних реакцій. Зважаючи на дані табл. 1 можна стверджувати, що така супресія відбувається переважно за рахунок зниження CD4⁺ лімфоцитів, але не можна виключити і паралельне зниження кількості CD8⁺ лімфоцитів, про що свідчать дані кореляційного аналізу. Слід зазначити, що новонародженим взагалі притаманна супресивна спрямованість імунних реакцій, оскільки у них переважають незрілі, так звані «наївні» Т-хелпери яким також притаманна супресивна дія, що посилює ефект CD8⁺ лімфоцитів. Вміст «наївних» Т-хелперів у новонароджених сягає 97% [2].

Звертає на себе увагу наявність у дітей із СПОН прямого кореляційного зв'язку між показниками експресії CD4, CD8 та CD95. Останній маркер близький до суперродини фактору некрозу пухлин і бере участь в апоптичному сигнальному шляху в Т-лімфоцитах [4]. Оскільки CD95 пов'язаний із активованими клітинами, то, по-перше, не можна виключити його участь в патогенезі СПОН, а по-друге, можна очікувати, що

при збільшенні кількості як CD4⁺ так і CD8⁺ лімфоцитів можна очікувати абсолютне збільшення виявлення експресії цього маркера.

Наведені зміни імунних реакцій у новонароджених із СПОН можуть бути пов'язані із рівнем концентрації ІФН- α . Цей цитокін починає вироблятися з 10 тижня гестації, досягає свого піку на 22-гий тиждень і визначається у всіх органах і тканинах плода і новонародженого. В даний час вважається, що ІФН- α виконує не скільки захисну скільки регуляторну функцію, зокрема по відношенню Т-клітинної ланки імунітету [3, 11].

В проведеному дослідженні було встановлено, що у новонароджених із СПОН порівняно з дітьми без такого синдрому спостерігалось значне зниження рівня концентрації ІФН- α : у перших він становив $34,3 \pm 5,6$ пг/мл (Me=16,2; 50L=8,2; 50U=68,5; $\Sigma r=677,0$; n=36), у других – $212 \pm 16,6$ пг/мл (Me=218,8; 50L=204,8; 50U=243,7; $\Sigma r=598,0$; n=14) (U=11,0; p<0,01).

Кореляційний зв'язок між фактом наявності СПОН і рівнем ІФН- α довів зворотну залежність між цими факторами: наявність СПОН корелювала із зменшенням рівня ІФН- α (R= -0,74; p<0,001).

Враховуючі зміни рівня ІФН- α і його імунорегуляторну дію не можна виключити вплив цього цитокіну на формування імунних змін при розвитку СПОН у новонароджених.

Висновки. Отримані результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. У новонароджених із СПОН має місце супресивний напрям імунних реакцій, що проявляється зниженням рівня CD4⁺ лімфоцитів і ІРІ.
2. Зниження ІРІ у новонароджених із СПОН має прямий зв'язок із зниженням рівня CD4⁺ і CD8⁺ лімфоцитів.
3. В патогенезі СПОН у новонароджених не виключена участь активації процесів апоптозу, про що свідчить прямий

кореляційний зв'язок між рівнем експресії CD4⁺, CD8⁺ і CD95⁺ лімфоцитів.

4. У новонароджених із СПОН має місце зниження рівня концентрації ІФН- α , що може відобразитись на його регуляторних впливах по відношенню до Т-клітинної ланки імунітету.

Список літератури.

1. Гринев М.В. Проблема полиорганной недостаточности /М.В. Гринев, А.В. Голубева // Вестник хирургии им. И.И. Грекова.- 2001.-Т. 160, №3.- С. 110-114.
2. Імунітет та імунодефіцит у новонародженого /Чернишова Л.І./ Неонатологія / [П.С. Мощич, О.Г. Суліма, Ю.І. Антипкін та ін.; За ред. П.С. Мощича, О.Г. Суліми] .-К.: Вища школа, 2004.- С.108-112.
3. Кешишян Е.С. Особенности системы интерферона у новорожденных. Обоснование применения препарата виферон в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний / Е.С. Кешишян, В.В. Малиновская // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии.-2006.-№3, Т.3.-С. 212-214.
4. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии /В.К. Козлов.-К.: «АННА-Т», 2007.- 296 с.
5. Лейдерман И.Н. Синдром полиорганной недостаточности. Метаболические основы: Лекция. Ч.1 / И.Н. Лейдерман // Вестник интенсивной терапии.- 1999.-№2.- С. 8-13.
6. Лимфоциты: методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса.-М.: Мир, 1990.-395с.

7. Проточная лазерная цитометрия в оценке иммунной системы человека / Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, Д.В. Мазуров и др. // Журнал микробиологии – 2002. - №6. – С.105 – 111.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / Реброва О. Ю. – М: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
9. Семенов В.Н. Апоптоз и его роль в патогенезе критических состояний / В.Н.Семенов, И.Н. Насечкин // Вестник интенсивной терапии.-2004.-№1.-С. 3-7.
10. Свідोцтво про реєстрацію авторського права на твір №15669 Україна. Науковий твір: «Таблиця критеріїв поліорганної недостатності у новонароджених» /Д.А. Шкурупій (Україна); зареєстровано 15.02.2006.
11. Шмелев В.А. Интерферон–гамма, фактор некроза опухолей, тирозин-альфа1 – противоиnфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты / Шмелев В.А. .-М.:МЕДПРАКТИКА-М, 2008.- 536 с.

Резюме. Імунні ланки патогенезу синдрому поліорганної недостатності у новонароджених. Д.А. Шкурупій, Н.Л. Куценко, Т.В. Мамонтова (м. Полтава)

У новороджених з синдромом поліорганної недостатності досліджена експресія маркерів Т-клітинної ланки імунітету (CD4, CD8, CD95) та рівень інтерферону-альфа. Доведений супресивний характер імунних реакцій та зниження рівня інтерферону-альфа у цього контингенту пацієнтів.

Ключові слова: новонароджені, синдром поліорганної недостатності, Т-лімфоцити, інтерферон-альфа

Резюме. Иммунные звенья патогенеза синдрома полиорганной недостаточности у новорожденных. Д.А. Шкурупий, Н.Л. Куценко, Т.В. Мамонтова (г. Полтава)

У новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности исследована экспрессия маркеров Т-клеточного звена иммунитета (CD4, CD8, CD95) и уровень интерферона-альфа. Доказан супресивный характер иммунных реакций и снижения уровня интерферона-альфа у этого контингента пациентов.

Ключевые слова: новорожденные, синдром полиорганной недостаточности, Т-лимфоциты, интерферон-альфа

Summary. Immune elements of pathogenesis of multiorgan failure syndrome at newborns. D.A. Shkurupiy, N.L. Kutsenko, T.V. Mamontova (Poltava)

Expression of clusters determination of T-cells immun links (CD4, CD8, CD95) and level of interferon-alpha at newborns with multiorgan failure syndrome was investigated. It was shown suppressive character of immune reactions and reduction the level of interferon-alpha in this contingent of patients.

Key words: newborns, multiorgan failure syndrome, T-cells, interferon-alpha.